



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106946866 A

(43)申请公布日 2017.07.14

(21)申请号 201710247954.6 *A61K 31/381*(2006.01)

(22)申请日 2017.04.17 *A61K 31/352*(2006.01)

(71)申请人 牡丹江医学院 *A61P 9/10*(2006.01)

地址 157011 黑龙江省牡丹江市爱民区通 *A61P 25/00*(2006.01)

乡街3号牡丹江医学院

(72)发明人 李雪梅 孙延斌 周雪 刘世娟  
展涛 王涵 梁春娥 吴宜艳  
沈广志 赵英福

(74)专利代理机构 北京辰权知识产权代理有限  
公司 11619

代理人 佟林松

(51)Int. Cl.

*C07D 407/06*(2006.01)

*C07D 409/06*(2006.01)

*A61K 31/4025*(2006.01)

权利要求书2页 说明书9页

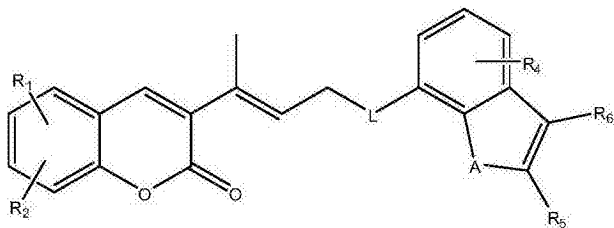
(54)发明名称

一种预防和治疗脑卒中的药物及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种预防和治疗脑卒中特别是缺血性脑卒中的药物。本发明通过研究分析本发明式I所示的香豆素衍生物的结构特点,并研究了其在大鼠体内的药效学特点,证实其具有预防和治疗脑卒中特别是缺血性脑卒中的作用。此外,本发明式I所示的香豆素衍生物在小鼠脑缺血再灌注试验中,显示出良好的治疗活性,其能够显著降低脑缺血再灌注小鼠的行为评分、并且可以减轻损伤脑组织的水肿程度和含水量,降低脑梗塞比例,其能够用于预防和治疗脑卒中特别是缺血性脑卒中。

1. 一种式I所示的香豆素衍生物,或其药学上可接受的盐、前药:



(I)

式I中:

$R_1$ 、 $R_2$ 选自氢、羟基、卤素、C1-6烷基、卤代C1-6烷基、C1-6烷氧基、C1-6烷氧基羰基、 $-NR_{11}R_{12}$ ;其中, $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 可以相同或不同,选自氢或C1-6烷基,或者 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 可以与其所连接的氮原子一起形成含氮的5或6元杂环烷基;

L表示 $-(CR_A R_B)_n-$ ,其中 $R_A$ 、 $R_B$ 可以相同或不同,各自独立地选自氢或C1-6烷基, $n$ 为0、1、2、3、4或5;

A选自0或S;

$R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ 选自氢、羟基、羧基、卤素、C1-6烷基、卤代C1-6烷基、C1-6烷氧基、C1-6烷氧基羰基、氰基。

2. 根据权利要求1所述的式I所示的香豆素衍生物或其药学上可接受的盐、前药,其特征在于,所述A表示0。

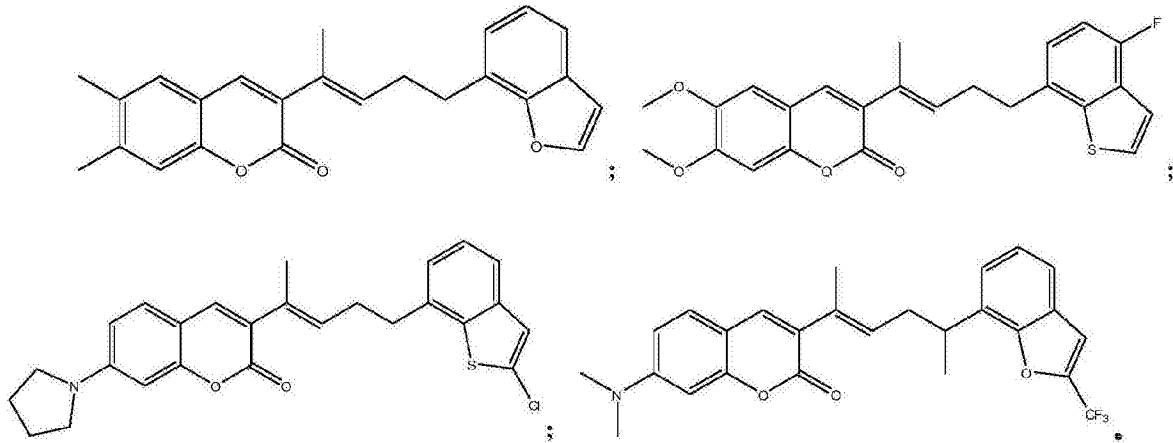
3. 根据权利要求1所述的式I所示的香豆素衍生物或其药学上可接受的盐、前药,其特征在于,所述A表示S。

4. 根据权利要求1所述的式I所示的香豆素衍生物或其药学上可接受的盐、前药,其特征在于,所述 $R_1$ 和 $R_2$ 表示C1-6烷基或C1-6烷氧基,优选甲基或甲氧基;或者 $R_1$ 和/或 $R_2$ 表示 $-NR_{11}R_{12}$ 。

5. 根据权利要求1所述的式I所示的香豆素衍生物或其药学上可接受的盐、前药,其特征在于,所述 $R_4$ 表示卤素,优选氟。

6. 根据权利要求1所述的式I所示的香豆素衍生物或其药学上可接受的盐、前药,其特征在于,所述 $R_5$ 表示卤素或卤代C1-6烷基,优选氯或三氟甲基。

7. 根据权利要求1所述的式I所示的香豆素衍生物,或其药学上可接受的盐、前药,其选自:

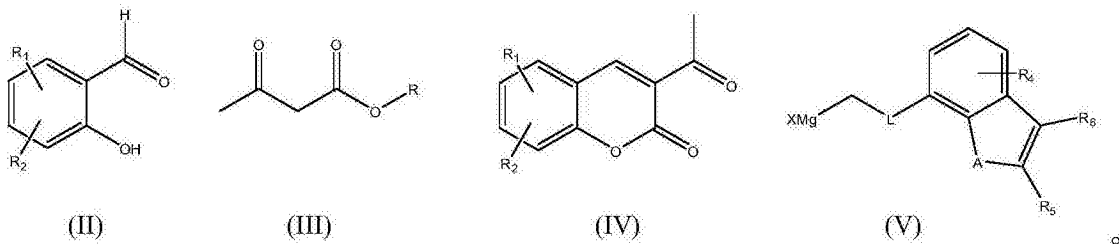


8. 一种药物组合物,其包含至少一种根据权利要求1-7任一项所述的式I所示的香豆素衍生物或其药学上可接受的盐、前药,以及药学上可接受的辅剂或赋形剂。

9. 根据权利要求1-7任一项所述的式I所示的香豆素衍生物或其药学上可接受的盐、前药在治疗脑卒中特别是缺血性脑卒中的应用。

10. 一种制备根据权利要求1中所述的式I所示的香豆素衍生物的方法,其包括以下过程:

使式II所示的邻香草醛衍生物与式III所示的乙酰乙酸酯在碱的存在下环合得到式IV所示的3-乙酰基香豆素衍生物,然后再在氯化锂的存在下与式V所示的格氏试剂反应,再经浓硫酸脱水,最终得到式I所示的香豆素衍生物:



其中, R<sub>1</sub>-R<sub>2</sub>、R<sub>4</sub>-R<sub>6</sub>、A、L的定义如权利要求1中所述;R表示C1-6烷基;X表示卤素,优选氯和溴;

碱包括醇盐例如甲醇钠、乙醇钠、乙醇钾,三乙胺、哌啶、吡啶等。

## 一种预防和治疗脑卒中的药物及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及医药技术领域,具体涉及一种用于预防和治疗脑卒中特别是缺血性脑卒中的药物,本发明还涉及所述药物的制备方法。

### 背景技术

[0002] 脑卒中主要分为出血性脑卒中和缺血性脑卒中两类,前者主要包括脑出血和蛛网膜下腔出血等;后者主要包括短暂性脑缺血发作、脑血栓形成及脑栓塞等。脑卒中是中、老年人的常见疾病,其死亡率是我们国家疾病死因的首位。存活者中仍有75%左右的患者在不同程度上出现残疾,严重致残者高达40%左右,成为了家庭、社会及国家的沉重负担。因此对具有危险因素的人群积极进行一级预防,以避免脑卒中的发生是极其重要的。

[0003] 缺血性脑卒中占全部脑卒中发病率的80%左右,并且其发病率随年龄的增长而增高。缺血性脑卒中的发生主要是由于脑栓塞及局部血栓的形成,这可能是由动脉粥样硬化引起的血管狭窄、血栓栓塞,或者是来源于心脏的栓子随血流至脑部引起脑栓塞;而各种原因造成的血管损伤、血管炎症也是重要原因之一。诸多原因引起脑部血液供应障碍,而造成受损脑组织的不可逆性损害,使得脑组织缺血、缺氧导致最终坏死,给患者造成一系列神经功能缺损和障碍。目前按照国际上公认的最常用分型标准的分类方法,缺血性脑卒中疾病TOAST分型系统,可将缺血性脑卒中分为5个亚型:大动脉粥样硬化型、心源性栓塞型、小动脉闭塞型及不明原因型。

[0004] 目前的药物治疗脑卒中旨在阻断缺血导致的神经元坏死、延长耐受性缺血时间和治疗时间窗,增强神经元生存能力,逆转半暗带,减少梗死体积,促进神经功能恢复。虽然各种化学药和天然药物处于不同研究阶段,但目前还没有一种药物取得公认的确切疗效,因此积极研发治疗药物具有重要的临床意义。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种新的预防和治疗脑卒中的药物,所述药物为香豆素衍生物。

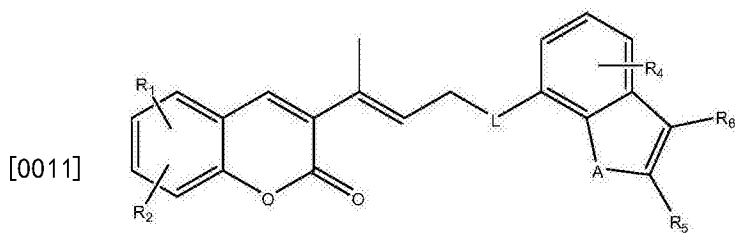
[0006] 本发明的另一目的在于提供一种制备所述香豆素衍生物的方法。

[0007] 本发明的又一目的在于提供一种含有至少一种所述香豆素衍生物的药物组合物。

[0008] 本发明的再一目的在于提供一种该类化合物在制备预防和治疗脑卒中特别是缺血性脑卒中的药物中的应用。

[0009] 本发明可采用如下技术方案:

[0010] 具体而言,本发明涉及一种式I所示的香豆素衍生物、或其药学上可接受的盐、前药:



(I)

[0012] 式I中:

[0013]  $R_1$ 、 $R_2$ 选自氢、羟基、卤素、C1-6烷基、卤代C1-6烷基、C1-6烷氧基、C1-6烷氧基羰基、 $-NR_{11}R_{12}$ ;其中, $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 可以相同或不同,选自氢或C1-6烷基,或者 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 可以与其所连接的氮原子一起形成含氮的5或6元杂环烷基;

[0014] L表示 $-(CR_A R_B)_n-$ ,其中 $R_A$ 、 $R_B$ 可以相同或不同,各自独立地选自氢或C1-6烷基,n为0、1、2、3、4或5;

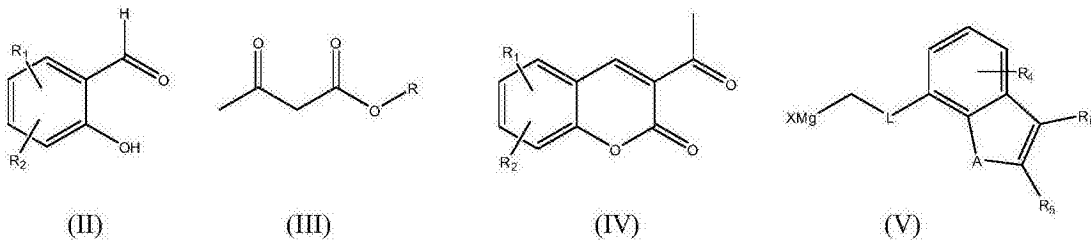
[0015] A选自O或S;

[0016]  $R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ 选自氢、羟基、羧基、卤素、C1-6烷基、卤代C1-6烷基、C1-6烷氧基、C1-6烷氧基羰基、氰基。

[0017] 制备本发明所述化合物的方法,包括以下步骤:

[0018] 使式II所示的邻香草醛衍生物与式III所示的乙酰乙酸酯在碱的存在下环合得到式IV所示的3-乙酰基香豆素衍生物,然后再在氯化锂的存在下与式V所示的格氏试剂反应,再经浓硫酸脱水,最终得到式I所示的香豆素衍生物。

[0019]



[0020] 其中, $R_1$ - $R_2$ 、 $R_4$ - $R_6$ 、A、L的定义如上所述;R表示C1-6烷基;X表示卤素,优选氯和溴;

[0021] 碱包括醇盐例如甲醇钠、乙醇钠、乙醇钾,三乙胺、哌啶、吡啶等。

[0022] 在本发明化合物的一个优选的实施方案中,A表示O。

[0023] 在本发明化合物的一个优选的实施方案中,A表示S。

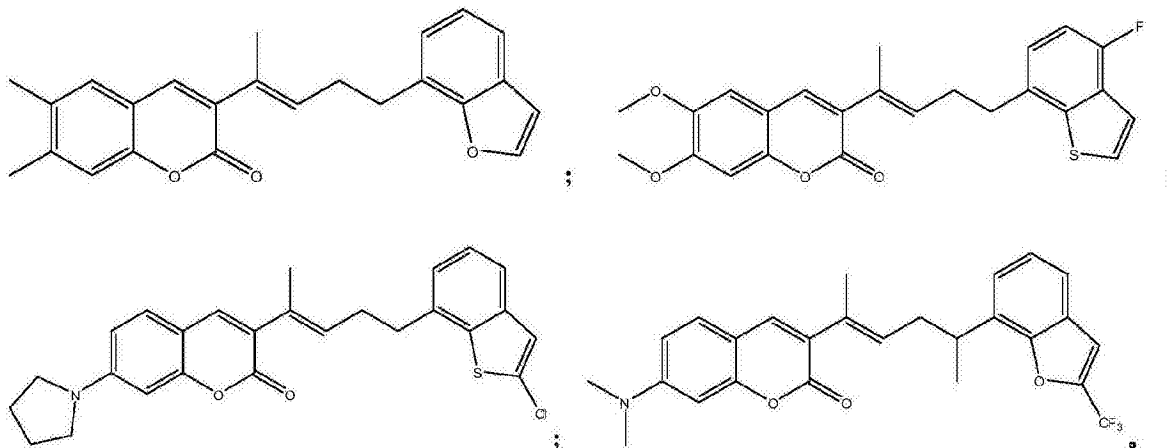
[0024] 在本发明化合物的一个优选的实施方案中, $R_1$ 和 $R_2$ 表示C1-6烷基或C1-6烷氧基,优选甲基或甲氧基;或者 $R_1$ 和/或 $R_2$ 表示 $-NR_{11}R_{12}$

[0025] 在本发明化合物的一个优选的实施方案中, $R_4$ 表示卤素,优选氟。

[0026] 在本发明化合物的一个优选的实施方案中, $R_5$ 表示卤素或卤代C1-6烷基,优选氯或三氟甲基。

[0027] 在本发明化合物的一些优选的实施方案中,所述化合物选自:

[0028]



[0029] 定义

[0030] 除非另外定义,本申请使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域技术人员通常所理解相同的含义。将本申请提及的所有专利和出版物通过引用的方式并入本文。

[0031] 术语“C1-6烷基”旨在表示当从烃除去一个氢原子时获得的基团。所述烷基可以为支链或直链且可以包含1-6个、诸如1-5个碳原子、诸如1-4个碳原子、诸如1-3个碳原子、诸如1-2个碳原子。术语包括子类正烷基(n-烷基)、仲烷基和叔烷基,诸如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、正己基。

[0032] 术语“卤素”旨在表示来自周期表第7主族的取代基,诸如氟、氯、溴和碘。

[0033] 术语“含氮的5或6元杂环烷基”旨在表示包含至少1个氮原子、1-5个碳原子和其他任选的0-3个选自氧、硫和氮的杂原子的5或6元的单环饱和环基,例如吡咯烷基、哌啶基、咪唑烷基、吡唑烷基、哌嗪基、高哌嗪基、噁唑烷基、吗啉基、硫代吗啉基等。

[0034] 式I所示的香豆素衍生物的药学上可接受的盐,是指式I所示的香豆素衍生物与药学上可接受的酸形成的加成盐。所述的酸包括:无机酸如盐酸、氢溴酸、硝酸、硫酸、高氯酸以及磷酸;或者有机酸例如柠檬酸、乙酸、乳酸、马来酸、富马酸、甲磺酸、琥珀酸、酒石酸、帕莫酸、谷氨酸、天冬氨酸、草酸、甲磺酸、乙磺酸、4-甲苯磺酸、水杨酸、柠檬酸、苯甲酸以及丙二酸。

[0035] 本文使用的术语“前药”包括可生物水解的酰胺和可生物水解的酯,并且也包括a)根据本发明的化合物包括这种前药中的可生物水解官能度的化合物,以及b)可以在指定的功能团被生物氧化或还原以产生根据本发明的药物物质的化合物。

[0036] 本文使用的术语“可生物水解的酰胺”是药物物质(在本发明中,式I所示的香豆素衍生物)的酰胺,其a)不干涉母体物质的生物活性,但赋予该物质体内有优势的性质,诸如作用持续时间、作用开始等,或b)无生物活性,但在体内容易被受试者转化为生物活性成分。所述优势是,例如,可生物水解的酰胺经肠进行口服吸收,并且可在血浆中转化为式I所示的香豆素衍生物。

[0037] 本文使用的术语“可生物水解的酯”是药物物质(在本发明中,式I所示的香豆素衍生物)的酯,其a)不干涉母体物质的生物活性,但赋予该物质体内有优势的性质,诸如作用持续时间、作用开始等,或b)无生物活性,但在体内容易被受试者转化为生物活性成分。所述优势是,例如,可生物水解的酯经肠进行口服吸收,并且可在血浆中转化为式I所示的香

豆素衍生物。

[0038] 本文使用的术语“药学上可接受的”意指适用于正常药物应用,即在患者等中不引起不良事件。

[0039] 本发明还涉及以式I所示的香豆素衍生物或其药学上可接受的盐、前药作为活性成份的药物组合物。所述药物组合物还可包含药学上可接受的辅剂或赋形剂。

[0040] 所述药物组合物可根据本领域公知的方法制备。可通过将式I所示的香豆素衍生物或其药学上可接受的盐、前药与药学上可接受的辅剂或赋形剂结合,制成适于人或动物使用的任何剂型。本发明化合物在所述药物组合物中的含量通常为0.1-95重量%。

[0041] 呈剂量单位形式的本发明化合物可以每天以适当间隔施用一次或多次。方便地,剂量单位的制剂含有0.1mg至1000mg,优选1mg至100mg,如5-50mg的式I化合物。本发明化合物的适合剂量将尤其取决于患者的年龄和疾患、待治疗疾病的严重性和其它执业医师所熟知的因素。

[0042] 所述制剂包括例如呈适用于口服(包括持续释放或定时释放)、直肠、胃肠外(包括皮下、腹膜内、肌内、关节内和静脉内)、经皮、眼部、局部、皮肤、鼻部、颊部或皮内施用的制剂。

[0043] 给药剂型可以是液体剂型、固体剂型或半固体剂型。液体剂型可以是溶液剂(包括真溶液和胶体溶液)、乳剂(包括o/w型、w/o型和复乳)、混悬剂、注射剂(包括水针剂、粉针剂和输液)、滴眼剂、滴鼻剂、洗剂和搽剂等;固体剂型可以是片剂(包括普通片、肠溶片、含片、分散片、咀嚼片、泡腾片、口腔崩解片)、胶囊剂(包括硬胶囊、软胶囊、肠溶胶囊)、颗粒剂、散剂、微丸、滴丸、栓剂、膜剂、贴片、气雾剂、喷雾剂等;半固体剂型可以是软膏剂、凝胶剂、糊剂等。

[0044] 作为可含在药物组合物中的药学上可接受的赋形剂和辅剂的实例,可提及稀释剂、粘合剂、润滑剂、防腐剂、增稠剂、稳定剂、崩解剂、湿润剂、乳化剂、缓冲物质、着色剂、矫味剂和香料,其实例为水、氯化钠生理溶液、植物油、蜡、醇、三醋精、聚乙烯基吡咯烷酮、明胶、纤维素、碳水化合物类、滑石、羊毛脂、凡士林或它们的混合物等。

[0045] 本发明的化合物或组合物可单独服用,或与其他治疗药物或对症药物合并使用。当本发明的化合物与其它治疗药物存在协同作用时,应根据实际情况调整它的剂量。

[0046] 本发明的另一个目的,在于提供式I所示的香豆素衍生物或其药学上可接受的盐、前药在制备药物中的应用,所述药物用于预防和治疗脑卒中,特别是缺血性脑卒中。

[0047] 有益效果

[0048] 本发明通过研究分析本发明式I所示的香豆素衍生物的结构特点,并研究了其在大鼠体内的药效学特点,证实其具有预防和治疗脑卒中特别是缺血性脑卒中的作用。此外,本发明式I所示的香豆素衍生物在小鼠脑缺血再灌注试验中,显示出良好的治疗活性,其能够显著降低脑缺血再灌注小鼠的行为评分、并且可以减轻损伤脑组织和水肿程度和含水量,降低脑梗塞比例,因此其能够用于预防和治疗脑卒中特别是缺血性脑卒中。

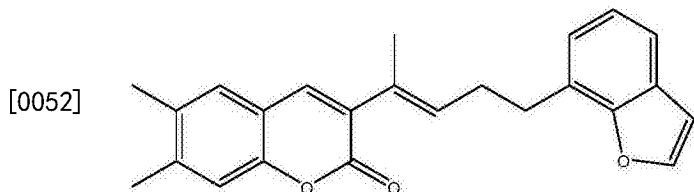
## 具体实施方式

[0049] 在下文中更详细地描述了本发明以有助于对本发明的理解。

[0050] 本发明化合物可以用合成领域技术人员熟知的许多方法来制备。式I化合物可以

例如使用下面列出的反应和技术连同合成有机化学领域已知的方法或本领域技术人员所理解的其变体来制备。优选的方法包括但不限于下面描述的那些方法。反应在适用于所用试剂和材料且适用于要实现的转化的溶剂中进行。此外,在下面描述的合成方法中,应理解所有建议的反应条件(包括溶剂、反应气氛、反应温度、实验持续时间和后处理程序的选择)都选择为该反应的标准条件,这应该被有机合成领域技术人员容易确认。并非所有落入给定类别的化合物可以与某些所述方法中需要的某些反应条件相容。对与反应条件相容的取代基的这些限制将对于本领域技术人员而言是显而易见的,并且可使用替代方法。

[0051] 实施例1: (E)-3-(5-(苯并呋喃-7-基)戊-2-烯-2-基)-6,7-二甲基-2H-色烯-2-酮(化合物A)



[0053] 将2-羟基-4,5-二甲基苯甲醛1.50g溶于200ml无水乙醇,加20ml乙酰乙酸乙酯和2ml哌啶,搅拌加热,数分钟后有固体出现,回流25min,冷至室温,过滤后得所需产物3-乙酰基-6,7-二甲基-2H-色烯-2-酮2.01g,产率93.1%,含量96.5%。ESI-MS: 217.08 [M+H]<sup>+</sup>

[0054] 将上述步骤中得到的3-乙酰基-6,7-二甲基-2H-色烯-2-酮1.08g和无水氯化锂0.43g溶于40ml干燥的四氢呋喃中,然后加入新制的(2-(苯并呋喃-7-基)乙基)镁氯化物1.53g溶于30ml四氢呋喃中的溶液,回流2h后将反应混合物冷却并加入20ml饱和氯化铵水溶液,水相用乙醚(2×75ml)提取,合并的有机相用盐水洗涤,无水硫酸钠干燥并在真空下浓缩。将其加入含有3ml浓硫酸和20ml冰醋酸的70℃热溶液中,然后搅拌10min,将反应混合物倒入100ml冰水中,然后用正己烷(2×75ml)提取,合并的有机相用饱和碳酸钠溶液和盐水洗涤,无水硫酸钠干燥并在真空下浓缩。粗产物用硅胶柱层析分离(流动相:正己烷:乙酸乙酯=6:1),得到了(E)-3-(5-(苯并呋喃-7-基)戊-2-烯-2-基)-6,7-二甲基-2H-色烯-2-酮1.02g,产率57.1%,含量99.1%

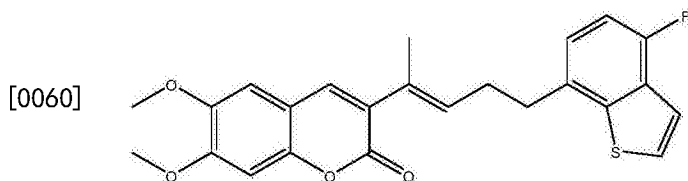
[0055] ESI-MS: 359.16 [M+H]<sup>+</sup>

[0056] 元素分析:理论值/实测值,C(80.42/80.52),H(6.19/6.17),O(13.39/13.31)

[0057] <sup>1</sup>H NMR(400MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ7.73(d,1H),7.54(s,1H),7.49(d,1H),7.41(s,1H),7.13(q,1H),7.01(d,1H),6.88(s,1H),6.54(d,1H),5.46(m,1H),2.56(t,2H),2.43(s,6H),2.28(m,2H),2.12(d,3H)。

[0058] 按照类似的方法,合成以下化合物:

[0059] 实施例2: (E)-3-(5-(4-氟-苯并[b]噻吩-7-基)戊-2-烯-2-基)-6,7-二甲氧基-2H-色烯-2-酮(化合物B)



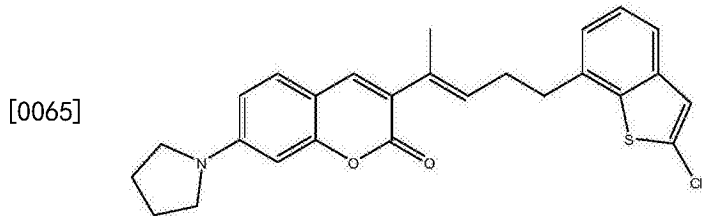
[0061] ESI-MS: 425.11 [M+H]<sup>+</sup>

[0062] 元素分析:理论值/实测值,C(67.91/67.78),H(4.99/5.07),F(4.48/4.57),O

(15.08/15.01), S (7.55/7.57)

[0063]  $^1\text{H NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.78 (d, 1H), 7.74 (d, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.31 (d, 1H), 7.13 (d, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.72 (s, 1H), 5.42 (m, 1H), 3.82 (s, 6H), 2.56 (t, 2H), 2.28 (m, 2H), 2.12 (d, 3H)。

[0064] 实施例3: (E)-3-(5-(2-氯-苯并[b]噻吩-7-基)戊-2-烯-2-基)-7-(吡咯烷-1-基)-2H-色烯-2-酮(化合物C)

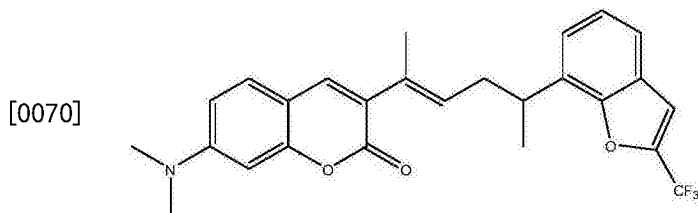


[0066] ESI-MS: 450.12  $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0067] 元素分析: 理论值/实测值, C (69.40/69.52), H (5.38/5.47), Cl (7.88/7.79), N (3.11/3.08), O (7.11/7.14), S (7.13/7.00)

[0068]  $^1\text{H NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.62 (d, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.47-7.32 (m, 3H), 7.02 (s, 1H), 6.67 (d, 1H), 6.51 (s, 1H), 5.43 (m, 1H), 3.42 (t, 4H), 2.56 (t, 2H), 2.28 (m, 2H), 2.12 (d, 3H), 1.82 (m, 4H)。

[0069] 实施例4: (E)-7-(二甲氨基)-3-(5-(2-三氟甲基苯并呋喃-7-基)己-2-烯-2-基)-2H-色烯-2-酮(化合物D)



[0071] ESI-MS: 456.17  $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0072] 元素分析: 理论值/实测值, C (68.56/68.52), H (5.31/5.47), F (12.51/12.58), N (3.08/3.04), O (10.54/10.39)

[0073]  $^1\text{H NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.72 (d, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.47 (d, 1H), 7.22 (q, 1H), 7.02 (d, 1H), 6.77 (s, 1H), 6.61 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 5.47 (m, 1H), 3.02 (s, 6H), 2.96 (m, 1H), 2.34 (m, 2H), 2.12 (d, 3H), 1.24 (s, 3H)。

[0074] 接下来, 通过实验例具体解释代表性化合物的药理效应。

[0075] 试验例1: 式I所示的香豆素衍生物治疗缺血性脑卒中的作用

[0076] 小鼠线栓法制作局灶性脑缺血模型的药理实验是验证药物具有防治缺血性脑卒中作用是常用的动物实验。用栓线法制备ICR小鼠脑缺血再灌注模型(制备方法详见《西药新药临床前研究指导原则汇编》的药学药理学毒理学部分, 中华人民共和国卫生部药政管理局, 1993:73;《药理实验方法学》第二版, 人民卫生出版社, 1982:830、1113), 除假手术组外, 其余各组均用该模型鼠试验。

[0077] 1、动物

[0078] ICR小鼠, 雄性, 体重20~22g。每组20只, 共分8组, 化合物A低剂量组: 1mg/kg; 化合

物A中剂量组:2mg/kg;化合物A高剂量组:4mg/kg;化合物B中剂量组:2mg/kg;化合物C中剂量组:2mg/kg;化合物D中剂量组:2mg/kg;假手术组:给予与药物实验组等量的生理盐水进行假手术;模型组:给予与药物实验组等量的生理盐水进行脑缺血再灌注手术。

## [0079] 2、实验方法

[0080] 将小鼠用10%水合氯醛腹腔注射麻醉,颈正中切口,分离、结扎右侧颈总动脉近心端、颈外动脉及其分支动脉。分离右侧颈内动脉,沿颈内动脉向下分离翼腭动脉,根部结扎该分枝。在颈内动脉近端备线、远端放置动脉夹,颈总动脉分叉处切口,插入尼龙线,栓线进入颈内动脉,入颅至大脑前动脉,阻断大脑中动脉所有血流来源。撤掉动脉夹,扎紧备线,外留1cm长线头,缝合皮肤。缺血1小时后静脉注射给药。继续缺血1小时后再灌注。再灌注8小时再次注射给药。假手术组除不插线外,其余步骤同上。

[0081] 观察再灌注24小时后存活鼠以下指标:

[0082] (1) 观察存活鼠24小时后行为变化,进行行为学评分:参考Zea Longa的5分制评分标准:0分为正常,无神经损伤症状;1分为不能完全伸展对侧前爪;2分为向外侧转圈;3分为向对侧倾倒;4分为不能自发行走,意识丧失。

[0083] (2) 对脑组织含水量的影响:每组取10只小鼠快速断头取大脑,分别称左右脑半球湿重,置100℃烤箱内烘干,24小时后称干重,按以下公式计算脑组织含水量:脑组织含水量(%) = (湿重-干重)/湿重×100%。

[0084] (3) 对脑梗塞体积的影响:每组取10只小鼠,处死取大脑,切下厚约2mm冠状脑片,立刻置于2%TTC溶液中,37℃孵育30分钟。梗塞区呈现白色,非梗塞区呈现红色。数码相机拍摄记录,用计算机图像处理测出各区面积,并计算梗塞区占整个脑组织的百分比(%)。

## [0085] 3、实验结果

[0086] (1) 试验化合物对脑缺血再灌注小鼠行为学评分的影响

[0087] 表1:实验各组小鼠脑缺血再灌注后的行为学评分

[0088]

组别	剂量 (mg/kg)	行为学评分(分)
假手术组	-	0
模型组	-	3.7±0.5
化合物A低剂量组	1	2.6±0.4 <sup>#</sup>
化合物A中剂量组	2	2.1±0.6 <sup>#</sup>
化合物A高剂量组	4	1.7±0.4 <sup>#</sup>
化合物B中剂量组	2	2.3±0.5 <sup>#</sup>
化合物C中剂量组	2	2.1±0.4 <sup>#</sup>
化合物D中剂量组	2	1.9±0.6 <sup>#</sup>

[0089] 注:与模型组相比,<sup>#</sup>P<0.05

[0090] 试验结果表明:假手术组小鼠未表现出任何异常症状。而模型组小鼠出现或向外侧转圈、或向对侧倾倒、或不能完全伸展对侧前爪的神经损伤症状。化合物A的低、中、高剂量组均可显著降低缺血再灌注小鼠的行为评分,并且其行为评分的降低程度与化合物A有明显的剂量依赖关系,化合物B、C和D也可显著降低缺血再灌注小鼠的行为评分,该结果证明上述试验化合物可以明显改善因缺血再灌注引起的神经损伤症状。

[0091] (2) 试验化合物对脑缺血再灌注小鼠脑组织含水量的影响

[0092] 表2: 对缺血再灌注小鼠脑组织含水量的影响

组别	剂量(mg/kg)	大脑左半球含水量(%)	大脑右半球含水量(%)
假手术组	-	72.3±1.1	72.4±1.3
模型组	-	72.5±1.3	78.6±1.7
化合物 A 低剂量组	1	72.6±1.2	75.2±1.4 <sup>#</sup>
化合物 A 中剂量组	2	72.3±1.3	74.5±1.6 <sup>#</sup>
化合物 A 高剂量组	4	72.5±1.1	73.4±1.2 <sup>#</sup>
化合物 B 中剂量组	2	72.4±1.2	74.5±1.7 <sup>#</sup>
化合物 C 中剂量组	2	72.3±1.0	74.6±1.5 <sup>#</sup>
化合物 D 中剂量组	2	72.1±1.2	74.0±1.3 <sup>#</sup>

[0094] 注: 与模型组相比, <sup>#</sup>P<0.05

[0095] 试验结果表明: 假手术组小鼠左右侧脑组织均无水肿。模型组小鼠缺血侧的脑组织含水量显著高于假手术组, 也高于其左侧脑组织含水量。而化合物A的低、中、高剂量组小鼠缺血侧的脑组织含水量显著低于模型组, 并显示出一定的剂量依赖关系, 化合物B、C和D也可以显著降低缺血侧的脑组织含水量, 该结果证明上述试验化合物可以减轻缺血再灌注损伤脑组织的水肿程度, 降低其含水量。

[0096] (3) 试验化合物对小鼠脑缺血再灌注模型脑梗塞面积的影响

[0097] 表3: 实验各组小鼠脑缺血再灌注后的脑梗塞面积

组别	剂量(mg/kg)	脑梗塞/全脑(%)
假手术组	-	0
模型组	-	49.3±2.9
化合物 A 低剂量组	1	33.1±3.1 <sup>#</sup>
化合物 A 中剂量组	2	23.7±3.0 <sup>#</sup>
化合物 A 高剂量组	4	10.4±1.8 <sup>#</sup>
化合物 B 中剂量组	2	24.3±4.1 <sup>#</sup>
化合物 C 中剂量组	2	23.9±3.6 <sup>#</sup>
化合物 D 中剂量组	2	23.6±3.9 <sup>#</sup>

[0100] 注:与模型组相比,<sup>#</sup>P<0.01

[0101] 试验结果表明:假手术组小鼠脑组织无梗塞。模型组小鼠缺血侧脑组织有明显梗塞现象,脑梗塞/全脑(%)为 $49.3 \pm 2.9\%$ 。而化合物A的低、中、高剂量组均可显著降低脑梗塞百分比,降低程度与药物有剂量依赖关系,化合物B、C和D也可以显著降低脑梗塞百分比,该结果证明上述试验化合物可以对小鼠脑缺血再灌注损伤引起的脑梗塞起到很好的保护作用。

[0102] 以上描述了本发明优选实施方式,然其并非用以限定本发明。本领域技术人员对在此公开的实施方案可进行并不偏离本发明范畴和精神的改进和变化。